

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 135 INTRODUCCIONES DE *Capsicum* PROCEDENTES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 135 INTRODUCTION OF *Capsicum* FROM THE BANK OF GERMPLASM OF THE NATIONAL UNIVERSITY OF COLOMBIA CAMPUS PALMIRA

Catherine Pardey Rodríguez y Mario A. García Dávila

RESUMEN

La caracterización molecular a 135 introducciones de *Capsicum* pertenecientes al banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, utilizando 32 iniciadores para microsatélites permitió identificar la variabilidad genética entre los individuos de las cinco especies estudiadas *Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens*. Los resultados mostraron que las introducciones se encuentran genéticamente más en estado homocigoto que en heterocigoto según los índices de *Fis* y *Fit*, la mayor variabilidad entre especies está en el complejo *annuum-frutescens-chinense* debido al mayor número de iniciadores polimórficos observados, 21 de 32. Los iniciadores que mostraron mejor polimorfismo fueron los de Lee et al. (2004), los cuales presentaron índices elevados de diversidad por poseer mayor cantidad de alelos por locus y a su vez por identificar mayor cantidad de alelos en estado heterocigoto. Por lo anterior, éstos serían útiles al momento de usarlos como medida de variabilidad genética. Las cinco especies se relacionaron genéticamente entre sí, la menor identidad genética se sucede cuando cualquiera de las especies se relaciona con *C. pubescens*; y entre *C. pubescens* y *C. baccatum*.

PALABRAS CLAVE: *Capsicum*, microsatélites, variabilidad, índices de diversidad

ABSTRACT

Molecular characterization of 135 introductions of *Capsicum* germplasm collection from National University of Colombia campus Palmira was carried out using 32 microsatellite primers for identifying a genetic variation among individuals of the five species studied: *Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, and *C. pubescens*. The results showed that introductions are more in homozygous than in heterozygous state based on the rates of *Fis* and *Fit*, the greater variability among species was found in the complex *annuum, chinense, frutescens* due to the number of polymorphic primers 21 of 32. The primers that showed the best polymorphism were those obtained from Lee et al. (2004), this primers showed high levels of diversity by having the highest number of alleles per locus and the higher number of alleles in heterozygous state; making them a powerful marker to measure genetic variability. The five species were genetically related to each other, however, the lower identity values occurred when any of the species was related to *C. pubescens*, or between *C. baccatum* and *C. pubescens*.

KEY WORDS: *Capsicum*, microsatellites, variability, diversity index

INTRODUCCIÓN

La presencia de variabilidad genética es una condición necesaria para la evolución de las especies. Los seres vivos varían, tanto entre especies como dentro de ellas; la herencia (descendencia) y la variabilidad (modificaciones) son los dos pilares sobre los que

descansa el mecanismo de evolución de las especies, ya que desde ahí es donde el individuo fija los genes de interés para sobrevivir (Fontdevila y Moya, 1999). La diversidad genética de las plantas está presente en los centros de origen la cual se ve amenazada por la actividad económica de la agricultura. Esta actividad disminuye la siembra de los cultivares nativos por

Dirrección de los autores:

Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad del Magdalena, Santa Marta. catty68@hotmail.com (C.P.R). Facultad de ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. magarciada@unal.edu.co (M.A.G.D).



especies mejoradas genéticamente que posee reducida la diversidad genética (el número de alelos para una característica de interés se encuentra reducido en la población comercial (Harlan, 1992). La erosión genética se evidencia cuando la especie se hace vulnerable al ataque de plagas y enfermedades. Por lo anterior, los agricultores y fitomejoradores se dieron cuenta de la importancia de conservar la diversidad genética presente en los cultivos nativos, especies silvestres, especies relacionadas, etc. almacenándola en los bancos de germoplasma. De estos bancos se pueden tomar los genes de interés para incorporarlos en los programas de mejora genética de las especies.

En Colombia existen oficialmente tres colecciones de *Capsicum* (Instituto Sinchi, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y Corpoica en Rionegro) con 1070 introducciones aproximadamente. El conjunto de este material representa la variabilidad biológica y geográfica de colectas realizadas fundamentalmente en la Zona Andina, Costa Atlántica y Amazonía colombiana (Torres y Reyes, 1997) o donaciones de otras instituciones internacionales de investigación, destacando el germoplasma introducido de Brasil, México y Costa Rica (García, 2007). En total, la colección ubicada en Palmira cuenta con 770 introducciones. Estos recursos genéticos en Colombia están siendo utilizados por el Programa de Mejoramiento Genético y Producción de Variedades Mejoradas de *Capsicum*, el cual está adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Sede Palmira (García, 2007).

En el caso de la colección de la Universidad Nacional, un 80% de los materiales están caracterizados con descriptores morfológicos y un 40% con caracterización bioquímica; sin embargo no existe la caracterización molecular, a pesar de que distintos autores en los últimos años apoyan la decisión de incluir la caracterización molecular en el estudio de colecciones de germoplasma y en particular del género *Capsicum* (Lefebvre et al., 1993; Rodríguez et al., 1999a; Rodríguez et al., 1999 b; Sanwen et al., 2001; Kang et al., 2001 y Kumar et al., 2001).

Los marcadores de tipo microsatélite se están utilizando en la estimación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, así como en muestras de introducciones de especies cultivadas o silvestres. Se dice que son útiles en los experimentos de mapeo de caracteres importantes y también que son una de las herramienta para el diseño

de estrategias de conservación de recursos genéticos y formación de colecciones núcleo (De Vicente, 2002).

Los microsatélites (SSR) son repeticiones de 2 a 8 pares de bases que pueden variar en el número de repeticiones. Estas repeticiones cortas son abundantes y frecuentemente extendidas en genomas eucarióticos, altamente polimórficos y fácilmente trabajados con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando iniciadores complementarios a la región flanqueante de la repetición. La identificación y secuenciación de los iniciadores es el paso más laborioso. Sin embargo, una vez desarrollados estos marcadores que son codominantes constituyen el sistema más informativo, incluso entre individuos emparentados (De Vicente y Fulton, 2004).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente 135 introducciones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira para identificar la variabilidad genética entre ellas usando la técnica de microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

La caracterización molecular usando la técnica de microsatélites se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia-Palmira en el periodo del 2005 al 2007. El estudio de diversidad genética se realizó en 135 introducciones de *Capsicum* las que se tomaron al azar del banco de germoplasma (Tabla 1). Los microsatélites se obtuvieron gracias a la información de varias secuencias de 13 *primers* suministrados por el Dr. Umesh K. Reddy, profesor de la Universidad de Virginia. Información adicional se obtuvo de los artículos de Sanwen et al. (2001) y de Lee et al. (2004) que permitió la obtención de 6 y 13 *primers*, respectivamente (Tabla 2).

Extracción de ADN

Las semillas de las introducciones de *Capsicum* fueron sembradas en bandejas plásticas debidamente identificadas. Cuando las plantas tenían 20 días de sembradas se cosecharon individualmente y se almacenó el material vegetal a -20°C. Para la extracción de ADN se siguió el proceso descrito por Dellaporta et al. (1983), ajustando las concentraciones a la especie en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (Pardey, 2008).



Tabla 1. Pasaporte de 135 introducciones del género *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Introducción* ¹	Especie	Origen	Introducción* ¹	Especie	Origen
PI145420	<i>C. annuum</i>	Colombia Colombia* ²	PI495744	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle
PI145420	<i>C. annuum</i>	Colombia Colombia* ²	Grif 5004	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI188476	<i>C. annuum</i>	México	PI496200	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle
PI194879	<i>C. annuum</i>	Guyana	PI496197	<i>C. annuum</i>	USA
PI200486	<i>C. frutescens</i>	Colombia Colombia* ²	PI496101	<i>C. frutescens</i>	Colombia Cesar
PI201227	<i>C. chinense</i>	Colombia Valle	PI496101	<i>C. frutescens</i>	Colombia Cesar
PI241675	<i>C. frutescens</i>	Ecuador	1047	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI257053	<i>C. annuum</i>	Colombia Bolívar	PI496033	<i>C. frutescens</i>	Colombia Nariño
PI257054	<i>C. annuum</i>	Colombia Bolívar	PI496033	<i>C. annuum</i>	Colombia Nariño
PI257058	<i>C. frutescens</i>	Colombia Bolívar	PI496021	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle
PI257060	<i>C. annuum</i>	Colombia Bolívar	PI496088	<i>C. frutescens</i>	Colombia Guaviare
PI495224	<i>C. annuum</i>	Colombia Choco	PI496089	<i>C. frutescens</i>	Colombia Guaviare
PI257088	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia	3009	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI257070	<i>C. baccatum</i>	Colombia Bolívar	PI496147	<i>C. frutescens</i>	Colombia Colombia* ²
PI257083	<i>C. frutescens</i>	Colombia Antioquia	PI497841	<i>C. frutescens</i>	Colombia Colombia* ²
PI260486	<i>C. chinense</i>	Bolivia	PI497881	<i>C. annuum</i>	Colombia Colombia* ²
PI260611	<i>C. annuum</i>	Brasil	3007	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI267728	<i>C. annuum</i>	Guatemala	1041	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI267731	<i>C. chinense</i>	Cuba	1043	<i>C. frutescens</i>	Colombia Antioquia
PI355395	<i>C. frutescens</i>	Ecuador	1019	<i>C. annuum</i>	Colombia Cesar
PI439446	<i>C. frutescens</i>	Peru	1019	<i>C. annuum</i>	Colombia Cesar
PI439492	<i>C. frutescens</i>	Brasil	1019	<i>C. annuum</i>	Colombia Cesar
PI439499	<i>C. frutescens</i>	Costa Rica	1014	<i>C. annuum</i>	Colombia S/der sur
PI439503	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	1028	<i>C. annuum</i>	Colombia Bolívar
PI439504	<i>C. frutescens</i>	Costa Rica	4014	<i>C. annuum</i>	Colombia Antioquia
PI439506	<i>C. frutescens</i>	Cuba	4047	<i>C. frutescens</i>	Colombia Vaupés
PI439507	<i>C. frutescens</i>	Ecuador	Cs403	<i>C. annuum</i>	Colombia Vaupés
PI439508	<i>C. frutescens</i>	Salvador	Cs80	<i>C. frutescens</i>	Colombia Caquetá
PI439510	<i>C. frutescens</i>	Guatemala	Cs201	<i>C. chinense</i>	Colombia Caquetá
PI441650	<i>C. frutescens</i>	Brasil	PI497978	<i>C. chinense</i>	Colombia Putumayo
PI493036	<i>C. annuum</i>	Colombia Colombia* ²	Cs259	<i>C. frutescens</i>	Colombia Putumayo
PI493245	<i>C. chinense</i>	Colombia Colombia* ²	Cs250	<i>C. annuum</i>	Colombia Putumayo
PI495035	<i>C. chinense</i>	Costa Rica	Cs276	<i>C. chinense</i>	Colombia Guainía
PI49435	<i>C. annuum</i>	Colombia Colombia* ²	Cs209	<i>C. chinense</i>	Colombia Putumayo
PI495077	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	170	<i>C. annuum</i>	Colombia amazonia
PI495110	<i>C. annuum</i>	Colombia Cundinamarca	PI543188	<i>C. annuum</i>	Bolivia
S25	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	3026	<i>C. frutescens</i>	Colombia Colombia* ²
S25	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	2 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
S31	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	3 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
S35	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	4 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
S36	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	6 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
Grif 9334	<i>C. frutescens</i>	Costa Rica	7 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
S07	<i>C. annuum</i>	Colombia Nariño	9 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
Grif 9322	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	10 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Antioquia
Grif 9322	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	11 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
Grif 9322	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	14 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
A3	<i>C. annuum</i>	EEUU	15 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
Grif 9315	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	17 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
Grif 9328	<i>C. frutescens</i>	Costa Rica	18 MC	<i>C. annuum</i>	Colombia Córdoba
E 10	<i>C. annuum</i>	Ecuador	19 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
PI495245	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle	20 MC	<i>C. chinense</i>	Colombia Córdoba
PI495252	<i>C. frutescens</i>	Colombia Choco	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle



Continuación de la Tabla 1.

Introducción*1	Especie	Origen	Introducción*1	Especie	Origen
Cayenne	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	991	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle
Habanero	<i>C. chinense</i>	Colombia Valle	993	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle
961	<i>C. pubescens</i>	Colombia Nariño	994	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle
968	<i>C. annuum</i>	Colombia Nariño	997	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle
970	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	999	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle
971	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	Serrano	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle
973	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	1002	<i>C. chinense</i>	Colombia Valle
974	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	PI257071	<i>C. frutescens</i>	Bolivia
975	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle	Cs243	<i>C. annuum</i>	Colombia Amazonía
977	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle	382	<i>C. chinense</i>	Colombia Vaupés
980	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle	PI257077	<i>C. annuum</i>	Guatemala
981	<i>C. frutescens</i>	Colombia Valle	963	<i>C. pubescens</i>	Colombia Nariño
987	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	965	<i>C. pubescens</i>	Colombia Nariño
988	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle	967	<i>C. pubescens</i>	Colombia Nariño
989	<i>C. annuum</i>	Colombia Valle			

Introducción*1 numeración asignada por los donantes

Origen*2 Introducciones de USDA que no reportaron el departamento en Colombia de donde fueron colectadas

Tabla 2. Secuencias de cebadores para microsatélites de *Capsicum* tomados de Sanwen et al. (2001); Umesh Reddy, Lee et al. (2004).

Consecutivo		Secuencia del cebador	Tm ^a (°C)	Tamaño (Pb)
S1	F	GCAAAAAGTGATGATTCATAAA	53.1	21
	R	TCACTTTCAAAGATTCTTAACAC	53.2	23
S2	F	GTACCTATGGGAATAAGCAAA	53.7	21
	R	CCAATTTGTCTGAAGTTGAGT	54.4	21
S3	F	GAAGAAGCCAGTAGAGGAGA	53.8	20
	R	CAGCACCTGAAGATGTAGAT	54.5	21
S6	F	AGTTAACAACCTTTGGTGCTGT	54.2	21
	R	TAATATGGTAAGCACATTCCA	53.4	21
S7	F	TGTTCCCTCTCTTCTTATCG	53.9	21
	R	CCGGAGATAAGATCTTGATAA	53.7	21
S8	F	ATAGCTCACATGCCCTATAAA	54.3	21
	R	AATCTTGAGCAATAATTGGAC	53.6	21
U1	F	GAA GCC AAA AAT AGG AAC G	52.4	19
	R	CCC GCT TGA GAT CTT GGA T	56.7	19
U2	F	GCA CAT TCA AGC TAG GCG CAG	61.8	21
	R	GGG TGC ATG ATA TTA TGT GAG	55.9	21



Continuación de la Tabla 2.

Consecutivo		Secuencia del cebador	T _m ^a (°C)	Tamaño (Pb)
U3	F	CTT AAG GGA CGT GAA CAA TTG	55.9	21
	R	CTG TCA CAT ATT CAT GCA TC	53.2	20
U4	F	CAT CCA AAC CCT AAT TCC ATC	55.9	21
	R	CTT TGG CTC TGA TAC CAA GCT TG	60.6	23
U5	F	GAT CTC AGT TCT ATC TAG CGG G	60.3	22
	R	CAG CCA ATC AGT TCA GTT TAG TG	58.9	23
U6	F	CAG AAT GAC CGA AT	40	14
	R	GAT ATA CTT TAC CTG AC	45.5	17
U8	F	GGC ATA GTT TTG CTT GTG AC	55.3	20
	R	CGA ATA CAT CTA TTG TGA CC	53.2	20
U9	F	CCC TCT TCA ATC CAA ATC AAC C	58.4	22
	R	CGT AGT CAG ATG TTG AAG TCG C	60.3	22
U10	F	CTT CCG TTC AAA CTT GTC TGC	57.9	21
	R	GGT TTG CAT ACA CTT GAC CCT C	60.3	22
U11	F	GGA GCT TCT CTT GAT AGA CAT C	58.4	22
	R	CCC AGA CCA CAC TAT GTG	56	18
U13	F	CGG TGA ATG GAC TGT CAT C	56.7	19
	R	CAC GAT GCT CCT TGG AGT	56	18
U16	F	GCG ATT ACA AAG TAC GAG TAG	55.9	21
	R	GAA TCA TGA CTT AGA GTT GGC AG	58.9	23
U20	F	CAT TTT CCT CAT GGG TCA C	54.5	19
	R	GTC GAC CAA TTG AGA AGT C	54.5	19
L1	R	AAG GGT GTA TCG TAC GCA GCC TTA	53	24
	L	CAT GAA TTT CGT CTT GAA GGT CCC	53	24
L2	L	TAC CTC CTC GCC AAT CCT TCT G	48	22
	R	TTG AAA GTT CTT TCC ATG ACA ACC	50	24
L3	L	AAT GCT GAG CTG GCA AGG AAA G	55	22
	R	TGA AGG CAG TAG GTG GGG AGT G	55	22



Continuación de la Tabla 2.

Consecutivo		Secuencia del cebador	Tm ^a (°C)	Tamaño (Pb)
L4	L	GGC GGA GAA GAA CTA GAC GAT TAG	56	25
	R	CCA CCC AAT CCA CAT AGA CG	50	20
L5	L	TGC TGG GAA AGA TCT CAA AAG G	63	22
	R	ATC AAG GAA GCA AAC CAA TGC	61	21
L6	L	GCT AAT TAC TTG CTC CGT TTT G	58	22
	R	AAT GGG GGA GTT TGT TTT GG	61	20
L7	L	TCC CAG ACC CCT CGT GAT AG	62	20
	R	TCC TGC TCC TTC CAC AAC TG	61	20
L8	L	GCA AGG ATG CTT AGT TGG GTG TC	64	23
	R	TCC CAA AAT TAC CTT GCA GCA C	63	22
L9	L	TTT AGG GTT TCC AAC TCT TCT TCC	61	24
	R	CTA ACC CCA CCA AGC AAA ACA C	63	22
L10	L	CAT GAC CAC CAT GAG GAT A	55	19
	R	GAT AGC CAC GAG CAT AGT ATT	54	21
L11	L	TGC TTG TTG TTT TTA CCC TCA GC	63	23
	R	AGT GAA AGG TGG GCA ACA GC	63	20
L12	L	GGC TAT TTC CGA CAA ACC CTC AG	65	23
	R	CCA TTG GTC TTT TCA CTG TTG TG	62	23
L14	L	TTT TTC AAT TGA TGC ATG ACC GAT A	64	25
	R	CAT GTC ATT TTG TCA TT ATT TGG	61	24

Amplificación de cebadores para microsatélites por PCR

Se construyeron matrices de datos binarios para cada marcador y se calcularon parámetros de diversidad entre introducciones de una especie y entre especies, número de alelos polimórficos, heterocigocidad, determinación de alelos únicos y número de alelos amplificados por cebador. La variación genética de los individuos con índice de Shannon, el índice de Nei como medida de

heterocigocidad. Los valores que tienden a cero en el índice de Shannon significaran baja probabilidad de obtener un individuo con alelos diferentes al común (se hace nulo cuando el cebador es Monomórfico). El índice de Nei cuantifica la probabilidad de que, en un locus, cualquier par de alelos escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí (heterocigoto). Para cuantificar la diversidad genética entre los individuos y visualizar la estructura dentro de este conjunto en particular, se usan los estadísticos de **F** para cada microsatélite. **F_{IS}** calcula



la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio entre los individuos. Los valores que tienden a 1 son alelos en estado homocigoto. F_{IT} mide la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en un grupo esta medida es similar a F_{IS} donde se mira la presencia de heterocigotos. F_{ST} mide el grado de diferenciación génica entre los individuos, en función de las frecuencias alélicas. El valor va de 0 a 1 donde cero no existe divergencia génica y 1 los alelos están fijados (IPGRI y Cornel, 2004). Para el análisis de los datos se usó el programa estadístico *Pop gene* (1997) utilizando el índice de Nei y Li, 1979. Para el agrupamiento jerárquico se utilizó el método de Agrupamiento con promedios aritméticos ponderados UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

RESULTADOS

Al considerar 135 introducciones como una población y después de la evaluación de las misma con 32 cebadores de microsatelites se determinó que está no se encontraba en equilibrio Hardy - Weinberg porque hubo una diferencia entre los genotipos observados con respecto a los esperados determinado por el número de alelos encontrados (Tabla 3). Para el “*complejo annuum-frutescens-chínense*” se presentaron 11 cebadores monomórficos; *C. baccatum* 29 cebadores monomórficos (un solo representante de la especie); *C. pubescens* con 5 introducciones traídas de Pasto (Nariño) con 22 cebadores monomórficos. Estos resultados mostraron el mayor nivel de polimorfismo en el “*complejo annuum-frutescens-chínense*” con 21 microsatélites polimórficos de los 32. En la especie de *C. pubescens* se detectaron 10 microsatélites polimórficos y en la especie *C. baccatum* se detectaron tres microsatélites polimórficos.

En la tabla 4 se muestra el número de alelos encontrados por microsatélite. Se hallaron entre 1 y 7 alelos. Los microsatelites que mostraron un alelo se consideraron cebadores monomórficos, estos no son útiles para buscar diversidad porque está presente 100% en el loci de la población muestreada. Los cebadores de Lee et al. (2004) presentaron la mayor cantidad de alelos por locus, por lo cual los hace ser útiles al momento de usarlos como medida de variabilidad genética. Seis de los 32 microsatelites evaluados reportan alelos raros, todos ellos acompañados de un alelo común.

En la tabla 4 se resume la variación genética para todos los individuos, al estimar el índice de Shannon

como medida de diversidad genética y el índice de Nei como medida de heterogocidad. Los cebadores de Lee et al. (2004) presentaron índices elevados de diversidad por poseer mayor cantidad de alelos por locus y a su vez presentar mayor cantidad de alelos en estado heterocigoto. No siempre por que se tengan varios alelos por locus ellos van a estar presente en estado heterocigoto que sería la forma ideal, aquí en el estudio se observó que los alelos se encontraron principalmente en estado homocigoto. Los resultados muestran que entre más alelos se encuentren por locus mayor es el índice de diversidad y a su vez entre menos alelos por locus menor índice de diversidad. Se halló que los cebadores S6, U1 y U11 presentaron índices de diversidad bajos, de no ser por los alelos raros que se encontraron en estado heterocigoto estos microsatélites actuarían como monomórficos. Los S6, U1 y U11 no son microsatélites útiles para trabajos de diversidad por ser monomórficos. El microsatélite S7 presento un índice de diversidad bajo al igual que el índice de Nei. En este trabajo se consideró como no útil para fines de estudios de diversidad.

Haciendo una selección de microsatélites útiles con base al índice de Shannon y de Nei se seleccionan los cebadores S2, U6, U8 y todos los cebadores de Lee et al. (2004).

En la tabla 5 se muestra el cálculo de la diversidad genética entre los individuos con los estadísticos de F . Los resultados mostraron una tendencia hacia genotipos homocigotos y el déficit de heterocigotos, esto se puede atribuir al apareamiento no aleatorio dentro de los individuos. F_{IT} mide la deficiencia o el exceso de heterocigotos y se halló que es baja. Este resultado corrobora el desequilibrio encontrado en Hardy - Weinberg que es consecuencia de la falta de apareamiento aleatorio de las especies. F_{ST} mide el grado de diferenciación génica entre los individuos, en función de las frecuencias alélicas. Los resultados muestran que los alelos estudiados tienden a ser comunes en el género, los alelos raros inyectan divergencia dentro de la especie donde es hallada. Los cebadores de Lee et al. (2004) son multialélicos, pero aun así los alelos son comunes dentro de los individuos. Los microsatélites S8, L8 y L11 fueron los que alcanzaron valores más altos de F_{ST} y esto se debe a la presencia de uno de los alelos en el locus que está fijado y el otro está en baja frecuencia, esta clase de microsatélites no discriminan dentro de los individuos.



Tabla 3. Valores de Chi Cuadrado para Equilibrio Hardy - Weinberg en 32 loci en cinco especies de *Capsicum*.

Cebador	<i>C. annuum</i>	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>C. pubescens</i>	General
S2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	Monomórfico	0.0000
S3	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
S6	1.0000	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	1.0000
S7	0.0060	Monomórfico	0.8100	1.0000	Monomórfico	0.0001
S8	0.0000	Monomórfico	0.0001	0.0000	1	0.0000
U1	0.4900	Monomórfico	1.0000	0.84	1	0.49
U2	0.0000	Monomórfico	0.83	0.038	0.26	0.0000
U3	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U4	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U5	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U6	0.0000	Monomórfico	0.039	0.023	Monomórfico	0
U8	0.0003	1	0.002	0.001	1	0
U9	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U10	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U11	Monomórfico	Monomórfico	0.87	0.89	1	0.81
U13	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U16	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U17	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
U20	Monomórfico	Monomórfico	0.0000	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
L1	0.0000	Monomórfico	0.0000	0.0000	Monomórfico	0.0000
L2	0.0000	Monomórfico	0.0002	0.0000	0.2000	0.0000
L3	0.0000	Monomórfico	0.0000	0.0000	0.34	0.0000
L4	0.6900	1	0.72	0.35	Monomórfico	0.83
L5	0.0000	Monomórfico	0.0000	0.0000	0.007	0.0000
L6	0.0000	Monomórfico	0.002	0.0000	0.95	0.0000
L7	0.0000	Monomórfico	0.0000	0.0000	0.21	0.0000
L8	0.0000	1	0.0001	0.023	Monomórfico	0.0000
L9	0.0000	Monomórfico	0.0002	0.0000	0.002	0.0000
L10	0.0000	1	0.0000	0.0000	Monomórfico	0.0000
L11	0.0000	1	0.010	0.0030	1.0000	0.0000
L12	0.0000	1	0.0006	0.0000	1.0000	0.0000
L13	0.0000	Monomórfico	0.0140	0.0001	Monomórfico	0.0000
Loci polimórfico	21	3	21	21	10	22
% loci polimórfico	65.62	9.38	65.62	65.62	31.25	68.75

Valores con cero significa que la cantidad de individuos observados difiere de los esperados.
 Valores igual a 1 significa que la cantidad de individuos observados se ajusta a los esperados
 Monomórfico, alelo fijado en la especie



Tabla 4. Resumen de la frecuencia de alelos encontrados en 32 microsatélites evaluados en 135 individuos de *Capsicum*

Cebador (locus)	Alelos						
	A	B	C	D	E	F	G
S2	0.2611	0.6278	0.1111				
S3	1.0000						
S6	0.9878	<u>0.0122</u>					
S7	0.8387	0.1613					
S8	0.7464	0.2536					
U1	0.0595	0.9405					
U2	0.1071	0.1429	0.7500				
U3	1.000						
U4	1.000						
U5	1.000						
U6	0.6905	0.2 857	<u>0.0238</u>				
U8	<u>0.0143</u>	0.4571	<u>0.0143</u>	0.5143			
U9	1.000						
U10	1.000						
U11	0.9813	<u>0.0187</u>					
U13	1.000						
U16	1.000						
U17	1.000						
U20	1.000						
L1	0.3162	0.4829	0.1667	<u>0.0342</u>			
L2	0.1697	0.2431	0.1606	0.4266			
L3	0.6038	<u>0.0231</u>	0.1154	0.1885	<u>0.0692</u>		
L4	0.6132	0.2311	0.1557				
L5	0.0240	0.0240	0.0720	0.1200	0.1160	0.2600	0.3840
L6	0.3679	0.6274	<u>0.0047</u>				
L7	0.2710	0.4813	0.2477				
L8	0.3488	0.6512					
L9	0.3882	0.3224	0.1513	0.1382			
L10	0.0534	0.3252	0.2718	0.3495			
L11	0.4565	0.4891	0.0543				
L12	0.2812	0.6719	0.0469				
L13	0.3812	0.4000	0.1250	0.0938			

Números subrayados con rojo, identifican los alelos raros

En la tabla 6 se muestran los cálculos de identidad genética entre las cinco especies de *Capsicum* los resultados indican que las cinco especies se identifican entre sí. Los valores menores se suceden cuando las especies se relacionan con *C. pubescens*. Entre *C. pubescens* y *C. baccatum* se presenta la menor identidad genética. Estos resultados concuerdan con los planteamientos relacionados a los centros de origen que se le atribuyen a las cinco especies domesticadas, los cuales están distantes entre sí pero cuando ocurre la polinización controlada dichas especies se cruzan entre

ellas. Estos mismos resultados se obtienen cuando se calcula la distancia genética entre las cinco especies con las características morfológicas. La figura 1, muestra el dendograma basado en la distancia genética de Nei por el método UPGMA que de igual manera confirma el menor distanciamiento entre las tres especies con respecto a *C. pubescens* porque es la especie originaria de clima frío que requiere de ambientes por encima de los 2500 m para su normal desarrollo (Eshbaugh et al., 1983).



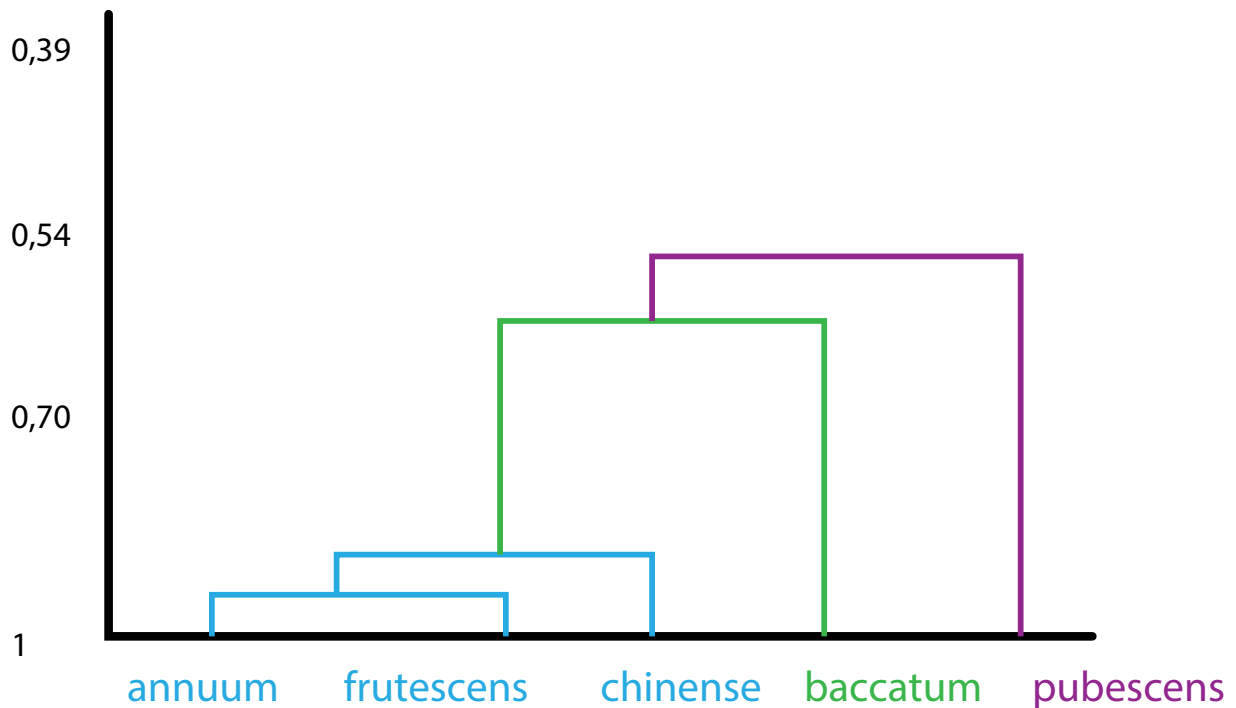


Figura 1. Dendrograma basado en la distancia genética de Nei's por el método UPGMA

DISCUSIÓN

El desequilibrio Hardy - Weinberg que se halló entre las 135 introducciones debido a las deficiencias de individuos en estado heterocigoto, se explica por los efectos de endogamia a los que son sometidos estas plantas en el proceso de expansión cuando solo son transportados pocos frutos para el establecimiento del cultivo; sumado a esto se atribuye a la escasa polinización cruzada natural, esta se presenta entre individuos emparentados. Los estudios de Odland y Porter (1941) informaron que las especies de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens* se autopolinizan en forma natural siendo el 16.5% de polinización cruzada realizada por abejas y el viento.

Según lo anterior trae como consecuencia la presencia de loci que no registran polimorfismo, los valores de 1 en la tabla 3 están expresando esa igualdad entre la población, esto es conocido como “cebadores monomórficos” pero varían según la especie (De Vicente y Fulton, 2004). El “complejo *annuum-frutescens-chínense*” se presentó la mayor variabilidad genética.

Los alelos raros encontrados inyectaron diversidad genética. Los alelos raros se definen como alelos presentes en una población con una frecuencia menor al 0,005. Fontdevila y Moya (1999) reporta que este tipo de alelos se presenta cuando la población fundada parte de un reducido número de individuos y esto es lo que sucede en *Capsicum*. Estos alelos raros son susceptibles de perderse por lo cual contribuyen poco a las medidas cuantitativas de heterocigosidad y varianza genética, mientras que los alelos frecuentes o comunes, son los que más contribuyen a estas medidas de diversidad, y que son los que permanecen en la siguiente generación.

La identidad genética entre las cinco especies de *Capsicum* confirman lo dicho por García (2007) y Pickersgill (1980) que el complejo *annuum-frutescens-chínense* es un grupo en vía de diferenciación y tienen ancestro común.

CONCLUSIONES

La muestra aleatoria de cinco especies de *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* del



banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira evaluadas con 32 microsatélites identificó que las poblaciones no están en equilibrio Hardy - Weinberg. Los valores de F_{IS} exponen una tendencia hacia genotipos homocigotos, F_{IT} muestran déficit de heterocigotos y F_{ST} muestran que los alelos estudiados tienden a ser comunes en el género.

El mayor nivel de polimorfismo se presenta en el “*complejo annuum-frutescens-chinense*” con 21 microsatélites polimórficos de los 32.

Los cebadores de Lee et al. (2004) presentaron índices elevados de diversidad por poseer mayor cantidad de alelos por locus y a su vez presentar mayor cantidad de alelos en estado heterocigoto por lo cual los hace útiles al momento de usarlos como medida de variabilidad genética. A diferencia de los microsatélites S6, S7, U1 y U11 no son útiles para trabajos donde se desea evaluar diversidad. Microsatélites útiles con base al índice de Shannon y de Nei son S2, U6, U8 y todos los de Lee et al. (2004).

Finalmente este trabajo permitió identificar genéticamente las cinco especies cultivadas. Los valores menores de identidad genética se suceden cuando las especies se relacionan con *C. pubescens*.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura por el financiamiento de esta investigación. Al personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por su orientación en el desarrollo de estas pruebas moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

Dellaporta, S.L., J. Wood y J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(14): 19-21.

De Vicente, C. 2002. Molecular techniques to facilitate prioritization of plant genetics resources conservation and further research. *Agbiotechnet* 4: 1-6.

De Vicente, C y T. Fulton. 2004. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje En Módulos de aprendizaje sobre marcadores moleculares IBPGR y el Instituto para la Diversidad Genómica (IGD). 1: 32 p.

IPGRI y Cornell University, 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje 86 p

Eshbaugh, W.H., S. I. Guttman y M. J. Mcleod. 1983. The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species *Journal of Ethnobiology*. 3: 49-54.

Fontdevila, A. Y. y A. Moya. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Editorial Síntesis, 349 p

García, M.A. 2007. Diversidad genética de *Capsicum* en Colombia. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Facultad de Ciencias Agropecuarias. 86 p.

Harlan, J.R. 1992. *Crops and Man*. 2nd ed. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. 284 p.

Kumar, L.D., M. Kathirvel, G.V. Rao y J. Nagaraju. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International*. 116: 63-68.

Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M. Kim y B.D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical y Applied Genetics* 108(4): 619-627.

Lefebvre, V., A. Palloix y M. Rives. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum L.*). *Euphytica* 71(3): 189 - 199.

Odland, M.L. y A.M.. Porter. 1941. A study of natural crossing in pepper (*Capsicum frutescensL.*). *Journal of American Society and Horticultural Science* 38: 585-588.

Pickergsill, B. 1980. Some aspects of interespecific hibritación in *Capsicum IV* Euocarpia *Capsicum* meeting Wageningen. pp 2-6.

Pardey, C. 2008. Caracterización y evaluación de accesiones de *capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y determinacion del modo de herencia a potyvirus. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 118 p.

Rodríguez, F., S. Toquica, M.D. Rodríguez, G. Cardona, M. Duque, J. Miles, M. Garcia y J. Tohme. 1999a. Morphological, biochemical and molecular characterization of promising Amazon species of the genus *Capsicum* for their conservation and use. pp 23-26. En: Annual Report 1999 assessing and utilizing agro biodiversity through biotechnology. CIAT, 395 p.



Rodríguez, J.M., T. Berke, L. Engle y J. Nienhuis. 1999b. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* 99 (1-2): 147-156.

Sanwen, H., Z. Baoxi, D. Milbourne, L. Cardle, Y. Guimei, y G. Jiazhen. 2001. Development of pepper SSR markers from sequence data bases. *Euphytica* 117(2): 163-167.

Torres, C. y C.L. Reyes. 1997. Informe nacional sobre recursos genéticos agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias- CORPOICA y Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santa Fe de Bogotá. 35 p.

Fecha de recepción: 3/09/2010
Fecha de aceptación: 20/01/2011

